

München. 1960

**Biologische Bestimmung von
Adiuretin an der Ratte**

Hubert Schmid

**Biologische Bestimmung von
Adiuretin an der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hubert Schmid
aus Zwiesler-Waldhaus

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Privatdozent Dr. E. BUCHBORN
Correferent:	Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1960



AUS DANKBARKEIT
MEINEN LIEBEN ELTERN
GEWIDMET

D I S P O S I T I O N

Seite

I. EINLEITUNG	5
1. Bedeutung des Wassers im Organismus	5
2. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes	5
a. hormonelle Steuerung	5
b. Bildungs- und Speicherungsstätte des ADH	6
c. Faktoren, die die ADH-Ausschüttung veranlassen	6
3. Bisher entwickelte Methoden zur ADH-Bestimmung an der Ratte	7
4. Problemstellung der Arbeit	15
II. METHODE	16
1. Vorbereitung der Tiere	16
2. Schilderung der Versuchsanordnung und ihrer Geräte	17
3. Arbeitsweise der Versuchsanordnung	17
III. ERGEBNISSE DER VERSUCHE	19
1. Wahl des Wirkungsindex	19
2. Statistische und mathematische Auswertung der Ergebnisse	21
a. Errechnung des mittleren Regressionskoeffizienten b	23
b. Prüfung der mittleren Signifikanz	23
IV. DISKUSSION	25
1. Vorbereitung der Tiere	25
2. Verhalten der Tiere im veränderten Milieu	26
3. Narkose der Tiere und ihre Auswirkung auf die normale Diurese	26
4. Bestimmung des Null-Punktes	28
5. Praktische Durchführung des ADH-Testes	28
V. ZUSAMMENFASSUNG	29
VI. ANHANG	30
1. Literatur	30
2. Kurvenbeispiele	33



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555225_0044

I. EINLEITUNG

1. Bedeutung des Wassers im Organismus

Der gesamte Wasserbestand des menschlichen Körpers beträgt ungefähr 60 - 65 % des Körpergewichtes.

Als universales Lösungsmittel umgibt es, zusammen mit den darin gelösten Stoffen, insbesondere der anorganischen Salze, extrazellulär alle Gewebe. Intrazellulär hält es die wichtigsten Stoffwechselprozesse an den Feinstrukturen in der Zelle, an den Mitochondrien und den Zellmembranen aufrecht. Diese Funktion ist abhängig von der optimalen und konstanten Zusammensetzung, von der Konzentration, vom Volumen und von der Verteilung des Lösungsmittels innerhalb und ausserhalb der Zelle.

Störungen in diesem Funktionskreis begegnen uns als unmittelbare Dysfunktion des Wasserstoffwechsels beim Diabetes insipidus, bei der Wasservergiftung oder als sekundäre Erscheinung anderer Krankheiten. Letztere treten auf in Form der pathologischen Wasserretention (Ödeme, Aszites) bei kardialen, renalen oder hepatischen Krankheitsbildern oder der Exsiccose nach anhaltendem Erbrechen und starken Durchfällen. Gleichfalls werden Störungen im Wasserhaushalt nach operativen Eingriffen beobachtet.

2. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes

Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, je nach Bedürfnis und Erfordernis des Organismus Wasser auszuschcheiden oder zu retinieren, wird in erster Linie durch die Nieren geregelt. Sie unterliegen ihrerseits hormonellen Einflüssen, also einer endokrinen Steuerung.

a. hormonelle Steuerung

Neben der hormonellen Beeinflussung des Mineralhaushaltes durch die Steroide der Nebennierenrinde und die Hormone des Hypophysenvorderlappens, der Schilddrüse und der Keimdrüsen spielt das antidiuretische Hormon (ADH) des Hypophysenhinterlappens im Wasserhaushalt die grösste Rolle.

Zum erstenmale entdeckte VAN DEN VELDEN (1913) und unabhängig von ihm im gleichen Jahre FARINI den diuresehemmenden Effekt des HHL-Hormons. Sie klärten damit die falsche Annahme von FRANK (1910), der Diabetes insipidus sei auf eine Überfunktion des HHL zurückzuführen, weil ein "Extrakt" aus dem HHL pressor-

risch, blutdrucksteigernd und damit diuresesteigernd wirkte (MAGNUS und SCHÄFER). VAN DEN VELDEN und FARINI konnten mit dem HHL-Hormon die Polyurie beseitigen. 1925 bewiesen STARLING und VERNEY an einem Herz-Lungen-Nieren-Präparat, dass das Adiuretin an den distalen Tubuli mit dem Effekt einer verstärkten Wasserresorption angreift.

b. Bildungs- und Speicherungsstätte des ADH

Über die Bildungs- und Speicherungsstätte des ADH herrschte lange Zeit keine Klarheit. Einerseits vertrat HANN (1918) die Ansicht, nur ein zerstörter HHL bei gleichzeitig intaktem HVL führe zum Diabetes insipidus. CAMUS und ROUSSEY (1920), sowie BALLEY und BREMER (1921) stellten andererseits fest, dass auch ein intakter HHL und HVL, jedoch eine Störung im Gebiete des Hypothalamus einen Diabetes insipidus entstehen lässt.

FISCHER, INGRAM und RAMSON fassten 1938 den Hypothalamus und den HHL, der mit diesem durch den Tractus supraopticohypophyseos verbunden ist, als funktionell zusammengehörendes System in dem Begriff der Neurohypophyse zusammen. SCHARRER wies 1929 nach, dass ihre Nervenzellen die Fähigkeit zu sezernieren besitzen. HILD und ZETLER zeigten mit einer von BARGMANN entwickelten spezifischen Färbemethode, dass das Sekret der Neurohypophyse das ADH enthält und dass das ADH im Hypothalamus gebildet und im HHL gespeichert wird.

c. Faktoren, die die ADH-Ausschüttung regulieren

Die Frage nun, welche Faktoren den HHL zu einer vermehrten ADH-Abgabe veranlassen, führte zum erstenmal GILLMANN und GOODMAN (1937), später VERNEY (1946) zu der Annahme eines Zusammenhanges zwischen ADH-Ausschüttung und Serumsmolarität. Letzterer erzielte durch Erhöhung der Serumsmolarität durch hypertonische NaCl-, NaSO₄- und Nichteletrolytinfusionen in die A. carotis interna eine Diuresehemmung. Daraus folgerte er, dass im Bereich dieser Strombahn Osmorezeptoren sassen, die je nach Änderung der Serumsmolarität die ADH-Abgabe aus dem HHL regeln.

Am Beispiel des Diabetes insipidus, also beim Fehlen des ADH, wird der diuresehemmende Effekt und damit die physiologische Bedeutung des ADH klar. Dagegen bleibt unklar die Bedeutung des ADH bei Erkrankungen mit sekundären Störungen des Wasserhaushaltes, nicht zuletzt deshalb, weil der direkte Nachweis der im Blut natürlicherweise vorhandenen ADH-Menge aus methodischen Gründen nicht oder nur unvollständig gelang.

3. Bisher entwickelte Methoden zur ADH-Bestimmung an der Ratte

Die grosse Anzahl der in der Literatur angegebenen Methoden und die Verwendung von verschiedenen Tierarten zeigen die Schwierigkeiten, die der ADH-Bestimmung im Plasma begegnen. VAN DYKE fordert deshalb in seiner Kritik der biologischen ADH-Nachweisverfahren vollkommene Spezifität, äusserste Empfindlichkeit und Genauigkeit in den Grenzen des biologischen Testes und auch einfache Durchführbarkeit.

Einige der wichtigsten bisher erschienenen und in der nachfolgenden Tabelle übersichtlich zusammengestellten Testverfahren zur Bestimmung des ADH an der Ratte seien kurz im Folgenden angeführt.

BURN erarbeitete im Jahre 1931 die erste brauchbare, auch heute noch verwendete Methode. Als Versuchstier nahm er die nicht narkotisierte Ratte. Er hydrierte das Tier vor dem Versuch mit 1,5 - 15 % ihres Körpergewichtes mit Wasser mittels einer Magensonde. Die Harnentleerung erfolgte durch Expression der Blase. Das Testmaterial wurde subcutan, intraperitoneal oder intravenös verabreicht. Als Wirkungsindex nahm er die Zeit von der Hydrierung bis zur maximalen Diurese. Er erreichte so bei seinen Versuchen eine Empfindlichkeit von 2 - 4 mE ADH/100 g bei einer Fehlerbreite von 25 % und mehr.

Gegen diese Methode wandten sich jedoch verschiedene Autoren (PICKFORD, GINSBURG und HELLER, VAN DYKE und M. MIRSKY und M. SCHREIBER). Die emotionelle und mechanische Irritation der leicht reizbaren Tiere und die ohne Narkose unvermeidbaren Schmerzreize durch diese Applikationsweise lösen bereits eine Diuresehemmung aus. Sie täuschen so einen antidiuretischen Effekt vor, auch wenn das Testmaterial kein ADH enthält. NOBLE u. M. zeigten, dass bei intraperitonealer Applikation durch toxische Substanzen eine zusätzliche Diurese einsetzt. CROXATTO u. M. begründen einen zu hohen ADH-Titer mit antidiuretisch wirkenden Substanzen, die durch fermentative Einwirkungen in der Bauchhöhle aus dem Serum freiwerden. VAN DYKE sieht dagegen die Ursache des ADH-Anstieges bei subcutaner Injektion in einer durch verunreinigende Begleitstoffe verzögerten Resorption. Demgegenüber bewies FRASER, dass bei intravenöser Applikation diese Differenzen im ADH-Titer nicht auftreten.

Im Jahre 1942 führten JEFFERS, LIVERZEY und AUSTIN zur Bestimmung des ADH die Titration an Rattenmännchen aus, deren Gewicht zwischen 180 und 200 g lag. Sie benützten Ratten von verschiedenen Stämmen zu ihren Versuchen. Die Tiere hungerten 12 - 18 Stunden vor Versuchsbeginn ohne Einschränkung der Wasserzufuhr. Die Narkose wurde mit 12 %igem Alkohol in einer Menge von 5 % des Körpergewichtes durchgeführt. 30 Minuten nach dieser Alkoholapplikation wurde das Versuchstier mittels einer Magensonde mit 3 % des Körpergewichtes Wasser hydriert.

Nach genügender Anästhesie wurde eine Glaskanüle nach vorheriger suprapubischen Laparatomie in die Harnblase eingeführt. Der Harn wurde in einem Messglas gesammelt und die Menge in 10-Minuten-Intervallen bestimmt. Sobald die Diurese nach dreimaliger Bestimmung konstant war, spritzte JEFFERS ADH in die präparierte Vena saphena ein. Vom Moment der Injektion an wurde die Harnmenge in Abständen von 4 Minuten abgelesen. Ausgewertet wurde der Abfall der Diurese 20 Minuten nach der Applikation des Testmaterials. Das Verhältnis zwischen dem Logarithmus der Dosis und der Grösse der Diuresehemmung war nach JEFFERS linear. Die Auswertung führte er an Ratten aus, bei denen die Diurese zwischen 0,5 - 1,3 pro 10 Minuten schwankte. An einem Tier konnte er höchstens viermal die Titration ausführen. Im Ganzen titrierte er 53 mal an 25 Tieren. Er applizierte Mengen von 20 - 320 mE ADH. Den Wirkungsindex berechnete er aus der Diurese vor der Injektion minus der Diurese 20 Minuten nach der Injektion und erreichte bei einer Empfindlichkeit von 0,02 - 0,03 mE ADH pro Titer eine Präzision von $\lambda = 0,249 \pm 0,040$.

BIRNIE, JENKINS, EVERSOLE und GAUNT legten ihren Arbeiten die Versuchsanordnungen von HELLER und URBAN zugrunde.

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten mit einem Gewicht von annähernd 200 g, die, ebenso wie bei JEFFERS u. M., 18 Stunden vor den Versuchen fastend, jedoch bei genügender Flüssigkeitszufuhr gehalten wurden. Zwei Gaben körperwarmen Wassers, jeweils 3 ccm pro qm Körperoberfläche, wurden den Tieren anschliessend in stündlichen Intervallen in besonders konstruierten Käfigen verabreicht. Eine Stunde nach der zweiten Dosis Wasser wurde der Urin gemessen. Jede Ratte, die während der zwei Stunden dieser Wässerung eine Ausscheidungsmenge von 50 % mehr oder weniger als den Diuresedurchschnitt von sechs Gruppen aufwies, wurde ausgeschieden. Die Ratten mit einer normalen antidiuretischen Reaktion wurden dann über gut gereinigte Trichter gelegt. Das Testmaterial wurde intraperitoneal injiziert und anschliessend nochmals eine dreimalige Hydratation durchgeführt. Der ausgeschiedene Harn wurde drei Stunden lang alle 30 Minuten gemessen. Diese Urinmenge bedeutete also die Ausscheidung der drei gegebenen Wasserdosen minus der Ausscheidung vor der Injektion des Testmaterials. BIRNIE glaubte zeigen zu können, dass diese Methode, die auf der Erzielung einer hohen Normaldiurese beruhte, eine bessere Deutung des ADH zuließ als die Versuchsanordnung von BURN.

Als Serum wurde von BIRNIE u. M. das nach einer kurzen Äthernarkose direkt ohne Zugabe von Antikoagulantien aus dem Herzen entnommene Blut verwandt. Es wurde sofort zentrifugiert, das Serum sofort dem Versuchstier injiziert. BIRNIE u. M. erhielten interessante Ergebnisse:

1. Die Injektion von einem ccm Serum senkte bei normalen Tieren das Urinvolumen.

2. Wenn das Serum bei $5 - 9^{\circ} \text{C}$ zwölf Stunden gestanden hatte, ging die Wirkung der antidiuretischen Substanzen verloren.
3. Das Serum von adrenaletomierten Tieren zeigte in der Zeit von 3 - 7 Tagen nach der Operation eine höhere antidiuretische Wirkung als die normalen Tiere.
4. Während der ersten 18 Stunden nach der Adrenaletomie zeigten die Ratten eine normale antidiuretische Reaktion auf kleine Wasserbelastungen (5 ccm pro 100 g).
5. Die Injektion von 5 mE Pitressin war bei den adrenaletomierten Tieren 18 Stunden nach der Operation wirksamer als beispielsweise bei den nicht operierten Tieren zum gleichen Zeitpunkt.

Daraus schlossen BIRNIE u. M., dass das Blutserum normaler Ratten eine labile antidiuretische Substanz(en?) enthält, die in ihrer Grösse nach Adrenaletomien zunimmt.

VAN DYKE stellte 1952 fest, dass zwar viele Methoden, aber noch keine genügend einfache und präzise Versuchsanordnung für die Bestimmung der antidiuretischen Hormone in der Neurohypophyse aufgezeigt worden seien. STEIN, JINKS und MIRSKY entwickelten daraufhin im gleichen Jahre ihre Methode.

Sie verwendeten als Versuchstiere weibliche Albino-Ratten mit einem Gewicht von 140 - 225 g. Sechzehn Stunden vor den Versuchen bekamen die Tiere keine Nahrung mehr, die Flüssigkeit wurde ihnen aber in genügender Menge belassen. Alle Versuche wurden in einem Raum mit einer konstanten Temperatur von $27 - 29^{\circ}$ durchgeführt. Pro 100 g Körpergewicht wurde den Tieren fünf ml warme, 0,2 %ige NaCl-Lösung zugeführt. Eine Stunde später wurde diese Gabe wiederholt und dann im Abstand von 20 Minuten das Volumen des ausgeschiedenen Urins gemessen. Es wurde dabei eine möglichst vollständige Entleerung der Blase angestrebt. Zwanzig Minuten nach der zweiten Gabe wurde 1 ml pro 100 g Körpergewicht einer isotonischen Lösung oder am Ende der ersten Stunde nach der ersten Gabe das gleiche Volumen einer in isotonischer Salzlösung gelösten antidiuretischen Substanz (ADH) intraperitoneal verabreicht. Die antidiuretische Reaktion auf die Injektion von ADH-haltigem Testmaterial wurde ausgedrückt in dem Quotienten aus dem Volumen des ausgeschiedenen Harns 20 und 60 Minuten nach der zweiten Gabe. Bei der Bestimmung der antidiuretischen Substanzen stützten sich STEIN u. M. auf die Angaben von BLISS (1944): Vier gleich grosse Gruppen von Ratten wurden ausgewählt. Zwei Gruppen wurden eine hohe und eine niedrigere Dosis eines Pitressin-Standardpräparates, den beiden anderen Gruppen eine hohe und eine niedrigere Dosis dieses eine "unbekannte" Menge Pitressin enthaltenden Präparates injiziert. Die Konzentration dieser beiden Testflüssigkeiten wurde so gewählt, dass das Verhältnis der hohen zur niederen Dosis des Standardpräparates das gleiche war wie das Verhältnis der hohen zur niederen Dosis des "unbekannten" Präparates.

In gleicher Weise wurde bei der Verwendung von Blutplasma und Urin zur Bestimmung der antidiuretischen Aktivität vorgegangen.

Die Arbeiten von STEIN u. M. ergaben eine Präzision von $\lambda = 0,329$, wobei die Empfindlichkeit der Methode zwischen 0,1 - 1,0 mE ADH lag.

CRAWFORD und PINKHAM verwendeten 1954 zu ihren Versuchen weibliche Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 g. Bevor sie in die Versuche genommen wurden, wurde ihnen mehreremale eine Magensonde eingeführt und intraperitoneal eine isotonische Lösung injiziert, um sie an diese Manipulationen zu gewöhnen. CRAWFORD verzichtete deshalb auf eine Narkose. Täglich, in unregelmässigen Abständen, wurden die Ratten mit einer konstanten Nahrung gefüttert. Diese Standarddiät garantierte eine relativ gleichmässige Ausscheidung von Urin durch die Nieren. Sechs Tiere, 16 - 18 Stunden vorher zum letztenmal gefüttert, wurden zu jedem Versuch verwendet. Anfangs erfolgte mittels einer Magensonde die Hydrierung mit 350 ml Wasser/qm Körperoberfläche bei 37°. 45 Minuten später begann die Diurese. 75 Minuten nach der ersten Hydratation erfolgte eine zweite mit 250 ml Wasser/qm Körperoberfläche. Dann wurden die Tiere in den eigens für die Urinsammlung konstruierten Käfig gebracht, der mit einem herausnehmbaren, rostfreien Stahldrahtgeflecht ausgerüstet war. Wenn während der nächsten 45 Minuten eine Menge von mindestens 4 ml wasserklaren Urins ausgeschieden wurde, konnte mit dem Versuch begonnen werden. Der Urin der nächsten drei 45-Minuten-Perioden wurde gesammelt. Zwischen U_1 und U_2 und nochmals zwischen U_2 und U_3 erfolgte die Zufuhr von 250 ml Wasser/qm Körperoberfläche, zwischen der Sammlung der Proben U_1 und U_2 wurde 0,5 ml einer 0,87 %igen NaCl-Lösung injiziert. Das zu untersuchende Testmaterial wurde intraperitoneal in einer Menge von 0,5 ml als isotonische Salzlösung zwischen den Sammlungen U_2 und U_3 injiziert. Mit Hilfe der Formel

$$\text{Diuresereaktion} = \frac{\frac{\text{ml H}_2\text{O}}{\text{mos M}} U_3 - \frac{\text{ml H}_2\text{O}}{\text{mos M}} U_2}{\frac{\text{ml H}_2\text{O}}{\text{mos M}} U_2} \quad 100$$

kamen CRAWFORD und PINKHAM auf eine Präzision von $\lambda = 0,13$, die also weit über der von STEIN u. M. ($\lambda = 0,31$) lag.

Als Grundlage für die Ausarbeitung einer eigenen Modifikation zur ADH-Bestimmung dienten HOLECEK, POLAK, BLAHA und JIRASEK 1954 die Titrationsmethode von JEFFERS und Mitarbeiter.

Die Versuche wurden mit männlichen Ratten eines Wistarstammes im Gewicht von 160 - 220 g, erst 10 - 14 Tage nach Überführung in das Laboratorium durchgeführt. Durch die Magensonde wurde zuerst 12 %iger Alkohol in einer Menge von 3 % des Körpergewichtes, nach 20 Minuten die gleiche Menge nochmals zugeführt. Fortgesetzt wurde die Hydratation viermal mit 1 % des Körpergewichtes in 10-Minuten-Intervallen. Nach einem suprapubischen Schnitt wurde in die Harnblase eine Glas-kanüle mit einem Schlauch eingebunden, dessen untere Öffnung unterhalb der Blase stand. Der damit erzielte Unterdruck in ihr verhinderte eine Ansammlung und damit unregelmässige Entleerung des Harnes. In die Vena saphena wurde eine Kanüle zur Injektion des Testmaterials eingebunden.

Die Grössen der einzelnen Urinmengen bewegten sich zwischen 0,6 - 2,1 ml/10 Minuten. Der Zustand der Hydratation wurde zwischen 5 - 8 % des Körpergewichtes gehalten und der Verlust durch die Ausscheidungen durch wiederholte Zufuhr in den Intervallen zwischen den einzelnen Titrationen ausgeglichen. So konnten stabile Resultate erzielt und laufend an einer Ratte 10 - 14 Titrationen durchgeführt werden. Als Testmaterial wurde 0,5 - 0,7 eines Extraktes des Voegtlin-Pulvers in die Vena saphena injiziert. Titriert wurden Gaben von 15, 30, 50, 100, 200 und 500 mE. Das Ergebnis zeigte eine grosse Empfindlichkeit, auch auf 15 mE bestand noch eine hundertprozentige antidiuretische Reaktion. Die Methode ermöglichte an einer Ratte 10 - 14 Titrationen. Die Signifikanz der Resultate war besser als bei den Versuchen von HELLER und BLACKMORE, NOBLE, PUNKERT und TAYLOR, AMES und VAN DYKE. Wegen der grossen Empfindlichkeit konnten auch kleinste ADH-Mengen titriert werden.

1957 entwickelte PAULISCH auf Grund der Arbeiten von JEFFERS, LIVEZEY und AUSTIN einen relativ einfachen und zuverlässigen Test an der Ratte.

Weisse männliche Ratten im Gewicht von 150 - 180 g und im Tierstall mit Latz-Standard-Rattenfutter und Leitungswasser gehalten, wurden ohne vorheriges Fasten verwendet. Durch eine Magensonde wurden sie mit 5 ml/100 g Körpergewicht Wasser hydriert, 45 Minuten später in gleicher Weise mit 12 %igem Alkohol anästhesiert. Nach ausreichender Sedierung der Tiere wurde in die Vena jugularis zur Injektion des Testmaterials und in die durch einen suprapubischen Schnitt freigelegte Blase ein Kunststoffkatheter eingebunden. Im späteren Verlauf des Versuches wurde als Ersatzflüssigkeit 1 %iger Alkohol nachgeführt, wobei das Körpergewicht der Ratte nicht mehr als 10 % ihres Ausgangsgewichtes überschritt. Auf einem Holzbrettchen fixiert, wurden die Ratten in den durch ein Kontaktthermometer auf einer konstanten Temperatur von 29° gehaltenen Versuchskasten geschoben. Jeder ausgeschiedene und durch zwei Elektroden fallende Urintropfen zog gleichzeitig das Relais eines 220 V-Wechselstromkreises an, schloss einen weiteren 24 V-Gleichstromkreis und registrierte die Tropfenzahl mittels eines in diesen Gleichstromkreis eingeschalteten Telephondrehwählers auf einen Registrier-

streifen mit einer optimalen Laufgeschwindigkeit von 1 cm/Minute. Ein in den 24 V-Gleichstromkreis eingeschalteter Stromkreis sorgte bei jedem zwölften Schritt des Telephondrehwählers für die Zufuhr von 12 Tropfen Wasser aus einem graduier-ten Gefäß. Sobald die Ausscheidung der Ratte über 20 Minuten gleichförmig und 0,5 ml/Minute betrug, wurde in 45-Minuten-Abständen die auf ihren ADH-Gehalt zu testende Flüssigkeit injiziert. Als ADH-Standard spritzte PAULISCH die Tone-phinabfüllung der Farbwerke Hoechst mit 500 000 mE in einem Milliliter ein. Zur Aufstellung der Eichkurven dienten ADH-Verdünnungen mit 0, 25, 50, 75 und 100 mE/ml.

Die registrierten antidiuretischen Effekte errechnete PAULISCH unter Verwendung verschiedener Wirkungsindices. Die daraus gewonnenen Dosiswirkungsgeraden ver-glich er statistisch und ermittelte die am besten zur Testung geeignete Gerade. Diese basierte auf einem Wirkungsindex, der die Ausscheidungszeiten für 2 ml Urin vor und nach dem Eintritt der Antidiurese in Beziehung setzt, und stellte eine antidiuretische Dosiswirkungsgerade dar, die von 0 - 100 mE Tonephin reichte.

Autor:n	Applikationsart	Experimentelle Bedingungen	Wirkungsindex	Empfindlichkeit	Präzision
BURN (1931)	subc.	16 Ratten in vier Gruppen eingeteilt, Gaben von 5 ml Wasser pro 100 g, danach ADH-Injektion, Urin alle 15 Minuten gemessen	Zeit von Hydrierung bis zur maximalen Diurese	2-4 mE ADH/100 g	Fehlerbreite 25 % und mehr
ANSELMINO, HOFFMANN u. KENNEDEY (1932)	subc.	Gabe von 90 ml Wasser, anschliessend ADH-Injektionen, Urin alle 30 Minuten gesammelt und gemessen	Natrium chloride excretion	0,15 (Pituitrin)	---
GILLMANN u. GOODMANN (1937)	subc.	Hydrierung mit 5 % drei Stunden vor dem Test	wie BURN	5 mE	---
ROBINSON u. FARR (1940)	intraperitoneal	10 Versuche an zwei Ratten. Gabe von 2,5 ml Wasser pro 100 g, dann nach 2 1/2 Stunden 5 ml Wasser pro 100 g. Dann ADH-Injektion. Urin alle 15 Minuten gemessen	Zeit, die erforderlich ist, um 2,5 % des KG auszuschcheiden	---	---
HAM u. LANDIS (1942) u. HAM (1942)	i. p.	Gabe von 2,5 ml 0,2 % NaCl pro 100 g KG, zwei Stunden später 5 ml pro 100 g. Gleichzeitig ADH-Injektion. Urin-Volumen-Bestimmung in 5-Minuten-Intervallen	Kurvenfläche f. Diurese u. Cl-Ausscheidung	Diurese: 0,5 mE Chlorid: 0,1 mE	---
JEFFERS, LIVEZEY u. AUSTIN (1942)	i. v.	Anfänglich Gabe von 5 ml wässriger Alkohollösung pro 100 g KG, 30 Minuten später 3 ml Leitungswasser pro 100 g, dann ADH-Injektion. Wenn gleichmässige Urinmengen ausgeschieden werden, Volumenmessung alle 4 Minuten während der Antidiurese	Diurese vor, minus Diurese 20 Minuten nach der Injektion	0,02 - 0,03 mE ADH pro Tier	= 0,249 ± 0,040
BIRNIE, JENKINS, EVERSOLE u. GAUNT (1949)	i. p.	Keine Narkose, orale Hydrierung	Diuresehemmung	---	---
RALLI, ROBSON, CLARKE u. HOAGLAND (1945)	i. p.	wie BURN	Diurese nach 185 Minuten Zeit bis 50 % H ₂ O-Ausscheidung mval Cl/min.	2-10 mE ADH	---

Autoren	Applikationsart	Experimentelle Bedingungen	Wirkungsindex	Empfindlichkeit	Präzision
BIRNIE, EVERSOLE, BOSS, OSBORN u. GAUNT (1950)	i. p.	3 Gaben von 3 ml H ₂ O/100 g KG in 3 Stunden Abstand, ADH-Injektion zur selben Zeit wie die 3. H ₂ O-Gabe, Urin- Messung 1 Stunde nach der 2. Dosis und alle 30 Minuten nach der 3. Dosis	Prozentsatz des ausgeschie- denen Wassers	---	---
STEIN, JINKS u. MIRSKY (1952)	subc.	keine Narkose, 2 mal 5 % des Körperge- wichtes Wasser	Quotient aus Diurese 20 und 60 Minuten nach der Injek- tion	0,1 - 1,0 mE ADH	- 0,329
BOURA u. DICKER (1953)	i. v.	Narkose mit Äthylalkohol, elektronisch gesteuerte Hydrierung, 5 % des Körper- gewichtes	Diuresehem- mung	0,01 mE pro Tier	---
CRAWFORD u. PINKHAM (1954)	i. p.	1,5 - 7 % Hydrierung	% Änderung der Urinkon- zentration	0,1 - 0,5 mE	- 0,13
HOLECK, POLAK, BLAHA, JIRASEK (1954)	i. v.	Narkose mit 12 %igem Alkohol, 3 % des KG. Hydrierung mit Äthylalkohol (konstant)	Diuresehem- mung	15 mE ADH pro ml	---
PAULISCH (1957)	i. v.	Narkose mit Äthylalkohol, Konstante und automatische Hydrierung ebenfalls mit Äthylalkohol	Ausscheidungs- zeit für 2 ml Harn vor und nach der In- jektion	10 mE ADH/ ml	= 0,22

4. Problemstellung der Arbeit

Wie schon früher erwähnt wurde, scheiterte bisher eine exakte Bestimmung des ADH - Gehaltes im menschlichen Plasma in erster Linie an der von VAN DYKE (1955) geforderten vollkommenen Spezifität, äussersten Empfindlichkeit und Genauigkeit in den Grenzen des biologischen Testes. Diese Punkte sah er in den bisher aufgezeigten Methoden an der Ratte nicht erfüllt. BUCHBORN erreichte in seinem Krötentest zwar bei einer hohen Spezifität eine Empfindlichkeit, die um eine Zehnerpotenz über der der bisherigen Verfahren liegt, erreichte aber keine genügend einfache Durchführungsmöglichkeit. d.h. für einen Versuch waren eine zu grosse Anzahl von Tieren nötig, die Testdurchführung dauerte zu lange und bei einer Versuchsreihe konnte an 18 - 20 Tieren nur immer der ADH-Gehalt eines Plasmas bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, eine Versuchsanordnung zu entwickeln, die einerseits die Empfindlichkeit bzw. Präzision der bisher angegebenen Ratten-, Hunde- und Krötenteste erreicht, andererseits auch eine relativ zuverlässige und einfache, klinische Durchführung gestattet.

Der von PAULISCH 1957 entwickelte Test an Warmblütern wurde hierzu in verschiedenen Punkten abgewandelt.

II. METHODE

1. Vorbereitung der Tiere

Verwendet werden zu den Versuchen weibliche Albino - Ratten, deren Gewicht zwischen 180 - 250 g liegt. Die Tiere sollen vor dem Versuch weder dursten noch fasten. Um die Tiere an die ihnen fremde Umgebung des Labors zu gewöhnen, (Helligkeit, Lärm der Geräte, Geruch der Chemikalien usw.) werden 3 - 4 Tiere in einem kleinen Käfig einige Stunden vor Versuchsbeginn dort abgestellt. 2 - 3 mal in stündlichem Abstand wird mittels einer Magensonde (einem sehr dünnen Gummikatheter) zur ausreichenden Hydrierung vor dem Versuch 5 ccm pro 100 g Körpergewicht Leitungswasser verabreicht. Die Sonde wird jedesmal wieder entfernt. Eine dauernde Narkose wird mit 12 %igem Äthylalkohol eingeleitet. Dazu werden die Tiere in einem Glasbecher kurz und oberflächlich mit Äther narkotisiert. Durch eine Magensonde werden nach Spreizung der Kiefer mittels einer Metallklammer und Fixierung der herausgezogenen Zunge 5 - 7 ccm 12 %iger, körperwarmer Äthylalkohol in wässriger Lösung mit 40 mg% K als KCl und 50 mg% als NaCl gegeben. Nach ungefähr einer Stunde werden in dreissigminütigem Abstand jeweils weitere 2 - 4 ccm 3 %igen Alkohols in wässriger Lösung mit 40 mg% K und 50 mg% Na verabfolgt, bis eine ausreichende Narkose erreicht ist. Eine tiefere Narkose wird jedoch vermieden. Die Tiere werden auf kleine Holzbrettchen gebunden. Ist eine Katheterisierung der Urethra nicht möglich (es legt sich meist eine Schleimhautfalte deckelartig vor das Orificium), so wird durch einen ca. 1 cm langen suprapubischen Schnitt die Blase freigelegt. Durch einen möglichst kleinen Schnitt am Fundus der entleerten Blase (wobei eine Verletzung oder Durchschneidung der Wandgefäße wegen des Blutverlustes zu vermeiden ist) wird in diese ein 10 - 15 cm langer, an seinem blasennahen Ende gefensterter PVC-Katheter eingebunden, um einen ungestörten Abfluss zu gewährleisten. Durch einige Stiche oder eine fortlaufende Naht werden die Muskulatur und das Fell verschlossen. Das äussere Ende des Katheters wird über eine Kanüle gestreift, die zur Verbindung mit den Elektroden dient. Zur Injektion des ADH-Standards (Tonephin) bzw. von biologischem Testmaterial wird nach genügender Hyperämisierung des Schwanzes mit Toluol eine Kanüle (Grösse 16) in eine der vier Schwanzvenen eingebunden. Von der Injektion in die Vena jugularis, wie sie PAULISCH beschrieb, wurde abgegangen, weil dabei ein Blutverlust nie ganz vermieden werden kann. Zur Verhinderung von Blutgerinnselbildung und der Verstopfung der Kanüle wird ein Tropfen Natrium citricum in die Kanüle gespritzt und diese mit einem Stöpsel verschlossen. Durch eine Magensonde werden nochmals 2 - 3 ccm einer 1 %igen Alkohollösung (mit 40 mg% und 50 mg% Na) zugeführt. Auf dem Holzbrettchen wird dann das Tier in einen Holzkasten geschoben, in dem mittels eines Kontaktthermometers eine konstante Temperatur von 29° gehalten wird.

Die Magensonde wird mit dem Magnetventil, der Blasenkatheter mit den Elektroden verbunden.

2. Schilderung der Versuchsanordnung und ihrer Geräte

Die Versuchsanordnung bzw. die für die Versuche benötigten Geräte wurden von Dr. Niklas an der Klinik gebaut.

Der thermokanstante Versuchskasten hat eine Grösse von 80 x 80 x 80 cm Kantenlänge. Seine Vorderwand ist mit einem Glasfenster versehen und kann heruntergeklappt werden. Sein Raum ist unterteilt durch ein herausnehmbares Brett, auf dem gleichzeitig drei Versuchstiere Platz finden. An seiner Vorderkante sind an drei Metallhalterungen jeweils zwei dünne Kupferelektroden und je ein verchromtes Metallröhrchen mit einer lichten Weite von 2 mm befestigt. An diesen werden die Blasenkatheter aufgesteckt, um die Tropfen zwischen die Elektroden zu leiten. Zwei am Boden des Kastens angebrachte 25 HK Kohlenfadenlampen sorgen für eine durch das Kontaktthermometer konstant gehaltene Temperatur von 29°. Drei am Dach des Versuchskastens befestigte Magnetventile werden einerseits mit der Magensonde andererseits mit einem Schlauch verbunden, der über ein Glasröhrchen zu einem Gefäss mit Ersatzflüssigkeit führt. An diesem Glasröhrchen kann die Tropfenzahl der zugeführten Flüssigkeit abgelesen und kontrolliert werden. Die Kontaktventile bzw. die Elektrodenteile sind mit drei Röhrenverstärkern verbunden, die am 220-Volt-Stromnetz angeschlossen werden. Parallel zu den Verstärkern ist ein Schreibgerät geschaltet. Sein Wechselstrom-Synchronmotor transportiert auf zwei Gummiwalzen einen Registrierstreifen (Cardiostat-Papier), auf dem ein elektromagnetisch gesteuerter Schreibzeiger jeden zwischen die Elektroden durchfallenden Tropfen als senkrechten Strich markiert. Die Laufgeschwindigkeit des Cardiostat-Papieres beträgt 15 mm pro Minute.

3. Arbeitsweise der Versuchsanordnung

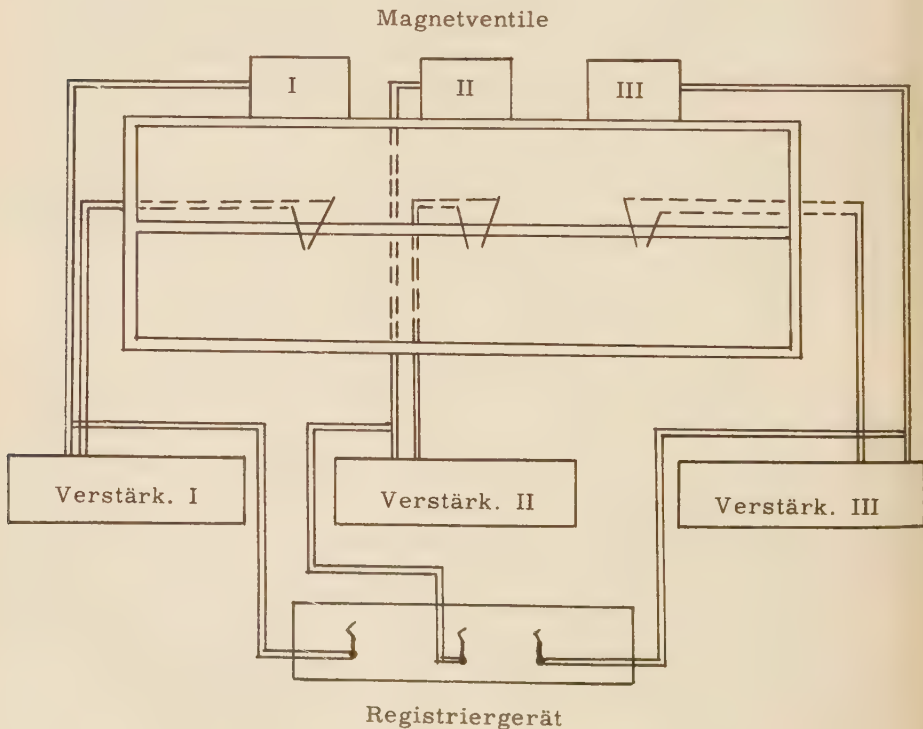
Fällt nun ein Tropfen von Blasenharne aus den Metallröhrchen durch die beiden Kupferelektroden, so wird über das Verstärkersystem ein Arbeitsstromkreis geschlossen (12 V-Wechselstrom) und über das oben beschriebene Registriergerät aufgezeichnet. Gleichzeitig wird durch Parallelschaltung das Magnetventil geöffnet, sodass für jeden sezernierten Harntropfen eine gleiche Flüssigkeitsmenge durch die Magensonde nachgeführt wird. Die Einstellung der Flüssigkeitsmenge geschieht entweder als Grobeinstellung mittels einer Schraube am Ventil oder an der elektrischen Feineinstellung am Verstärker. Es ist also durch Einstellung am Verstärker bzw. am Magnetventil möglich, die Zufuhr an Ersatzflüssigkeit zu drosseln oder zu beschleunigen.

Aus Zweckmässigkeitsgründen und zur Vereinfachung wird nicht wie z.B. bei PAULISCH jeder dritte Tropfen sondern jeder einzelne Tropfen registriert.

Sobald eine über 15 - 20 Minuten gleichmässige Urinausscheidung von mindestens 0,1 ml pro Minute erfolgt, kann mit der Injektion der auf Adiuretin zu testenden Flüssigkeit begonnen werden.

Für die Versuche wird zur Aufstellung der Eichkurven als Adiuretin-Standard eine besonders eingestellte Tonephin-Abfüllung der Farbwerke Hoechst verwendet (Charge 6/45), die in einem ml 500 000 Mikroeinheiten enthält. Die gleiche Charge wird auch von BUCHBORN als Standard in seinem Krötentest und von PAULISCH in seinem Rattentest verwendet. Zur Aufstellung der Eichkurven wird jedesmal vor Versuchsbeginn eine Adiuretin-Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung mit 25, 50, 75 und 100 Mikroeinheiten im Milliliter hergestellt. Von diesen Verdünnungen werden pro Ratte jeweils ein ccm mit einer Tuberkulinspritze in die Schwanzvene injiziert und mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgespült. Ist nach einem antidiuretischen Effekt die Normalausscheidung wieder eingetreten, so wird bis zur Injektion der nächsten Verdünnung 15 - 30 Minuten gewartet.

Abbildung 1: Schaltschema



III. ERGEBNISSE DER VERSUCHE

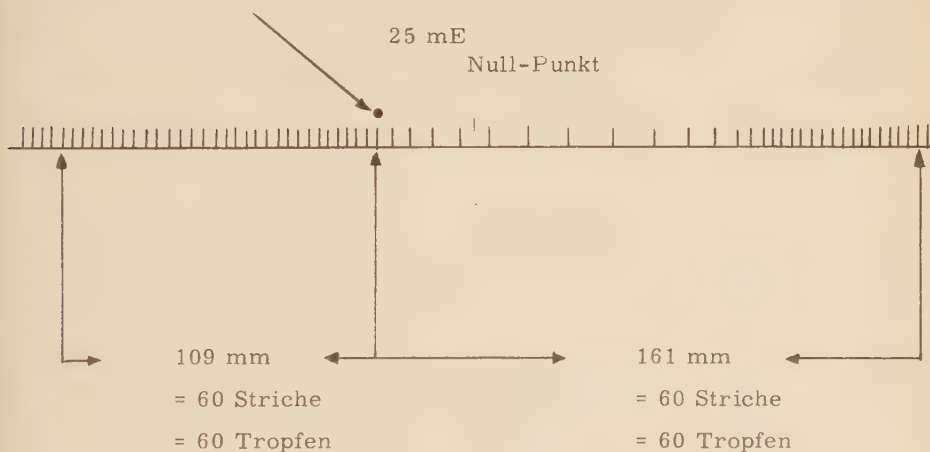
1. Wahl des Wirkungsindex

Zur Bestimmung der antidiuretischen Aktivität im Testmaterial wurde der von PAULISCH angegebene Wirkungsindex W_{T2} benutzt:

$$W_{T2} = \frac{\text{ben. Zeit zur Ausscheidung von 2 ml Urin nach dem Nullpunkt}}{\text{ben. Zeit zur Ausscheidung von 2 ml Urin vor dem Nullpunkt}}$$

Als Nullpunkt wurde nach dem Vorgehen von PAULISCH der Strich auf dem Cardiostatpapier gewertet, der dem ersten antidiuretischen Effekt unmittelbar vorausgeht. Tritt keine Hemmung der Diurese ein, so wird der Strich zwei Minuten nach der Injektion als Nullpunkt markiert (DICKER).

Abbildung 2



Beispiel für die Auswertung eines antidiuretischen Effektes an der Versuchskurve vom 1.11.58 - Kurve II. Laufgeschwindigkeit des Cardiostat-Papiers: 15 mm pro Minute. Jeder Strich bedeutet einen ausgeschiedenen Tropfen Urin. Gezählt werden sechzig Striche vor dem Null-Punkt und sechzig Striche nach dem Null-Punkt.

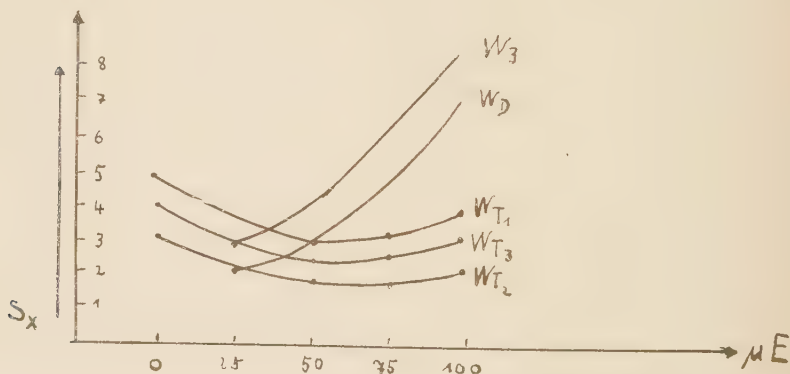
$$W_{T2} = \frac{161 \times 100}{109} = 147,71$$

In der Regel konnte bei den meisten Versuchen beobachtet werden, dass die normale Diurese nach der Injektion zunächst noch $1/2 - 1$ Minute anhält, ja sogar nach der Injektion ca. eine Minute lang eine beschleunigte Ausscheidung erfolgt, möglicherweise infolge der akuten Plasmavolumenzunahme durch die Injektion.

Der Wirkungsindex W_{T2} wurde gewählt, da er von den fünf Wirkungsindizes W_J , W_D , W_{T1} , W_{T2} und W_{T3} , die bereits zum Teil von JEFFERS u. M. und von DICKER angegeben worden sind, nach Untersuchungen von PAULISCH die beste Dosiswirkungsgerade diejenige ist, die auf dem Wirkungsindex W_{T2} beruht. Das heisst mit dem Wirkungsindex W_{T2} kann eine antidiuretische Aktivität mit der grössten Präzision ausgewertet werden. W_{T2} ist darnach eine arithmetische Dosiswirkungsgerade, deren Abszissenpunkte einen Bereich von 0 bis 100 Mikroeinheiten Standard-Tonephin umspannen, d. h. es lassen sich auch die Werte der Verdünnungs Null eintragen, was bei einer logarithmischen Dosiswirkungsgeraden nicht der Fall wäre.

Wie die von PAULISCH übernommene Abbildung drei zeigt, haben die arithmetischen Dosiswirkungsgeraden eine symmetrische Verteilung ihrer Streuungswerte. In ihrer Mitte liegt das Minimum, nach beiden Seiten zeigt sich eine leichte Zunahme der Streuung s_x .

Abbildung 3



2. Statistische und mathematische Auswertung der Ergebnisse

Zahl der verwerte- ten Kurven	25	50	75	100 mE/ml
1	158,12	165,04	170,15	186,92
2	118,18	169,37	145,22	151,50
3	161,15	177,34	246,55	289,38
4	211,70	246,16	297,85	349,54
5	122,86	160,00	170,84	192,65
6	111,86	149,63	188,53	202,42
7	118,48	136,69	146,58	167,74
8	165,72	209,73	225,38	238,46
9	159,39	201,01	224,36	232,49
10	147,71	205,17	259,82	300,00
11	113,00	144,44	160,00	192,97
12	135,10	151,50	173,40	190,30
S (12)	1723,27	2116,08	2408,68	2694,37
$\bar{x} = \frac{1}{N} S(x)$	143,605	176,34	200,7233	224,530

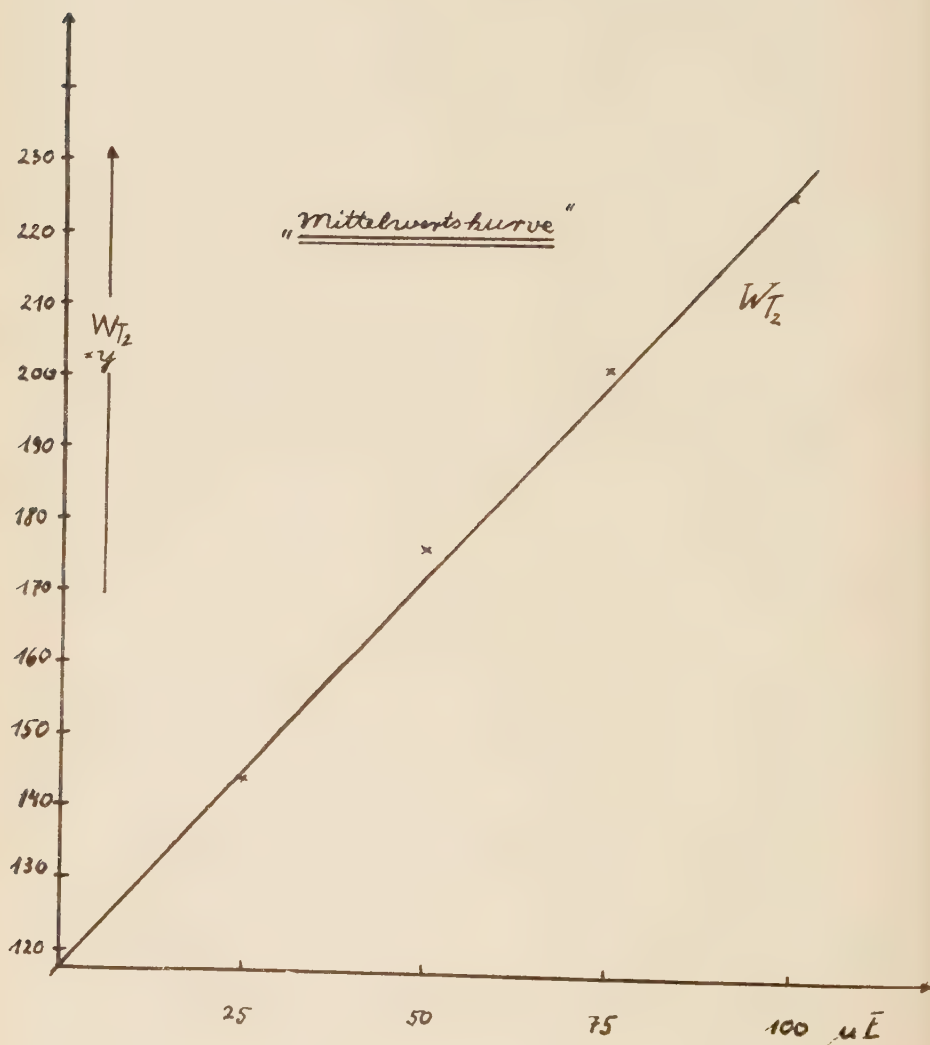
Aus den zwölf benutzten Kurven errechnen sich mit Hilfe der Formel

$$\bar{x} = \frac{1}{N} S(x)$$

die Y-Werte für die Verdünnungen 25, 50, 75 und 100 mE ADH/ml. Sie bilden die Ordinatenwerte der "Mittelwertskurve". Die Summe der Ordinatenwerte beträgt $S(y) = 745,1983$, der Mittelwert $\bar{y} = 186,29957$ (siehe folgende Tabelle).

x	y	S(y)	$\bar{y}$
25	143,605	745,1983	186,29957
50	176,34	745,1983	186,29957
75	200,7233	745,1983	186,29957
100	224,530	745,1983	186,29957

Abbildung 4: "Mittelwertskurve"



a. Errechnung des mittleren Regressionskoeffizienten b.

$$b = \frac{S(xy) - \bar{y} S(x)}{S(x^2) - \bar{x} S(x)}$$

	xy	S(xy)
25	3590,125	49914,373
50	8817,000	49914,373
75	15054,248	49914,373
100	224530,00	49914,373

$\bar{y} S(x)$	46574,893
$S(x^2)$	18750
$\bar{x} S(x)$	15625
b	1,068

$$\underline{b = 1,068}$$

b. Prüfung der mittleren Signifikanz

$$1. \quad s_y^2 = \frac{S(y^2) - \bar{y} S(y) - b(S(x^2) - \bar{x} S(x))}{n - 2}$$

$$2. \quad \text{Standardabweichung } s_b = \frac{s_y}{\sqrt{(S(x^2) - \bar{x} S(x))}}$$

$$3. \quad \text{Abweichung t (STUDENT)} = \frac{b}{s_b}$$

s_y	s_b	t	n	P
1,96	0,035178	30,38	46	< 0,0001

$$P = 0,0001$$

IV. DISKUSSION

Viele Autoren, unter ihnen BURN (1931), STEIN, JINKS und MIRSKY (1952), DICKER (1953) und VAN DYKE (1955) haben sich mit dem genauen und quantitativen Nachweis des antidiuretischen Hormons (ADH) im Blutplasma und Harn beschäftigt und versucht, einen für die beim Menschen vorkommenden ADH-Mengen geeigneten Adiuretin-Test an Warmblütern zu finden. Mehr als 20 Methoden zeigen die Schwierigkeiten, die bei der Adiuretinbestimmung an der Ratte auftreten. Am schwerwiegensten sind dabei:

1. die mangelnde Spezifität der Diuresehemmung an der Ratte, die auch durch andere im Plasma und Urin enthaltene Substanzen als ADH erzeugt wird. Erwähnt wurden schon die toxischen und verunreinigenden, resorptionsverzögernden Begleitsubstanzen, dann vor allem auch die osmotisch wirksamen Stoffe aus Karnkonzentraten und das natriumretinierende, an der Ratte besonders wirksame Aldosteron. ERSBAMER und SALA, ERSBAMER und OTTOLENGHI zeigten an der Ratte die vasokonstriktorische Wirkung des 5-Hydroxytryptamins auf die afferenten Glomerulusarteriolen, die durch Dibenamin verhindert werden kann und zu einer glomerulären Diuresehemmung führt. ERSBAMER und SALA wiesen nach, dass der von HELLER im Rattenblut gefundene und dort in erheblichen Mengen vorhandene stabile antidiuretische Faktor, der im BURN-Test eine deutliche Antidiurese erzeugte, identisch ist mit dem 5-Hydroxytryptamin.
2. das verschiedene Verhalten der antidiuretischen Aktivität des gleichen Ausgangsmaterials bei den verschiedenen Versuchstieren und bei wechselnder Applikationsart an derselben Spezies. Antidiuretische Substanzen aus Harnkonzentraten von Leberzirrhotikern wirken intraperitoneal appliziert bei der Ratte stark diuresehemmend, während sie am hydrierten Hund auch in sehr hohen Dosen unwirksam bleiben (RALLI u. Mit.). An der Katze geht die vasopressorische Eigenschaft des ADH nach Gaben von Thiosorbatol verloren, die antidiuretische Wirkung an der Ratte dagegen nicht (CROXATTO u. Mit.). Natriumthioglykollat vernichtet die diuresehemmende Wirkung des ADH am Hund, nicht aber an der Ratte (AMES, MOORE und VAN DYKE). LEWIS konnte bei gleichzeitiger Bestimmung der antidiuretischen Aktivität des menschlichen Plasmas an der Ratte und am Menschen lediglich an der Ratte eine antidiuretische Reaktion feststellen, während am Menschen schon 1 mE ADH zu einer messbaren Diuresehemmung führt.
3. die starke emotionelle Reizbarkeit der Ratte. MIRSKY, STEIN und PAULISCH zeigten, dass schmerzhafte Stimuli, wie sie durch die intraperitoneale Injektion oder durch die mit der Hydrierung verbundenen Manipulationen entstehen, Lärm oder der Aufenthalt der Tiere in einer ungewohnten

Umgebung zu einem Anstieg der antidiuretischen Aktivität im Rattenserum führen. Diese Beobachtungen machte SCHREIBER schon nach mechanischem Schütteln der Tiere.

Aus diesen Gründen ist die Ratte in den bisherigen Testanordnungen als Versuchstier ungeeignet. BUCHBORN versuchte diese Schwierigkeiten dadurch zu umgehen, dass er in seinem ADH-Test die Kröte als Versuchstier verwendet. Er erreicht damit bei hoher Spezifität eine Empfindlichkeit, die um eine Zehnerpotenz über der der bisherigen Verfahren liegt und einen Bereich von 0,01 - 1,0 mE des internationalen ADH-Standards umfasst. Die Genauigkeit entspricht der durch die Ratten- und Hundeteste erreichten Präzision. Die Nachteile dieser Kröten-Methode liegen einmal in der grossen Anzahl der benötigten Tiere, sodann an der langen Testdauer und vor allem darin, dass bei einer Versuchsreihe an 18 - 20 Tieren nur immer der Adiuretingehalt einer Plasmaprobe bestimmt werden kann. Gerade der Vorteil eines Rattentestes, gleichzeitig an je drei Versuchstieren den ADH-Gehalt in drei verschiedenen Proben bestimmen zu können, gab den Anstoss, die von BURN und DICKER sowie von PAULISCH angegebene Methode anzuwenden und zu verbessern.

Im Folgenden seien die Einwände der oben genannten Autoren gegen die Ratte als Versuchstier, weiterhin die bei den eigenen Versuchen aufgetretenen Probleme besprochen.

1. Vorbereitung der Tiere

Zu den Versuchen wurden weisse, weibliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 180 und 250 g verwendet, die sich in einem guten Ernährungszustand befanden und noch nicht gesäugt wurden. Grössere Tiere zeigten unter der Belastung lange dauernder Versuche meist schon nach kurzer Zeit eine Neigung zum Lungenödem, ohne eine ausreichende Diurese erreicht zu haben. Die Tiere unter 180 g Gewicht schieden als ungeeignet aus, da die Schwanzvenen zu klein waren, um eine Kanüle dauerhaft einzubinden. Vorteilhaft war ferner bei Tieren zwischen 180 und 250 g, dass der Katheter in die Urethra eingeführt werden konnte und die Blase deswegen nicht eröffnet werden musste. Im Gegensatz zu JEFFERS und DICKER wurden den Tieren die Nahrung 12 - 18 Stunden vor Versuchsbeginn nicht entzogen. Vielmehr wurden nur Tiere verwandt, die noch genügend Futter und Flüssigkeit im Käfig hatten. Dadurch befanden sich die Tiere im Stoffwechselgleichgewicht, besonders was den Wasserhaushalt betrifft, da mit dem Entzug der Nahrung auch die Trinkmenge abnahm (PAULISCH). Gleichzeitig wird damit erreicht, dass die Ratten während des späteren Verlaufes der Versuche viel zäher und emotional weniger reizbar waren als die fastenden Tiere.

2. Verhalten der Tiere im veränderten Milieu

Viele Autoren bestreiten die Brauchbarkeit der Ratte als Testtier wegen ihrer starken Reizbarkeit. Sie wird deshalb z.B. als Modelltier zur experimentellen Erzeugung eines "essentiellen Hochdruckes" allein durch psychische Stimulation benutzt (FARRIS 1945, Mc CANN u. Mit. 1948, SELYE 1950). SCHREIBER beobachtete eine Diuresehemmung allein durch mechanisches Schütteln. MIRSKY, STEIN und PAULISCH bemerkten eine vermehrte, freilich sicher nicht mit ADH identischer antidiuretischer Aktivität im Rattenserum bei schmerzhaften Eingriffen, Lärm usw. Schmerzen bei intraperitonealer Injektion oder die mit der Hydrierung verbundenen Manipulation der Magensondierung führten ebenso zu einer Zunahme der antidiuretischen Aktivität im Blut wie ähnliche Reize am Hund (O'CONNOR) und am Menschen (KELSALL). Eigene Beobachtungen zeigten, dass die Tiere, die vor den Versuchen in einem abgedunkelten, vor Lärm und mechanischen Reizen geschützten Raum im Kellertierstall untergebracht waren, sich sofort attoniert zeigten, sobald sie ins Versuchslabor mit seinem Lärm, dem Geruch der Chemikalien und der Helle des Tageslichtes gebracht wurden, also in ein ihnen fremdes Milieu. Sie reagierten mit starker Gereiztheit und Angriffslust, verweigerten Wasser und Nahrung und die normale Diurese blieb oft stundenlang aus.

3. Narkose der Tiere und ihre Auswirkung auf die normale Diurese

Für die Versuchsdurchführung müssen die Tiere ausreichend sediert werden. Vor der Einführung der Magensonde hat sich ein kurzer und oberflächlicher Ätherrausch als zweckmässig erwiesen, um eine Irritation möglichst zu vermeiden. Zur eigentlichen Vollnarkose während des Testes wurde zuerst 12 %iger und dann 34 %iger Äthylalkohol verwendet, in dem 40 mg% Kalium und 50 mg% Natrium gelöst waren, um den Elektrolytbestand, der durch die anhaltende maximale Diurese absinken würde, zu konservieren. Durch den zugeführten Alkohol ist die Ratte so ausreichend sediert, dass äussere Reize (siehe oben!) auf die Diurese keinen Einfluss mehr haben. Der wichtigste Vorteil der Alkoholnarkose liegt aber in der vollständigen Hemmung der endogenen ADH-Produktion der Versuchstiere, die ja bei den früheren Versuchsanordnungen im Zusammenhang mit exogenen Reizen verschiedenster Art so störend in Erscheinung trat. Bei einigen Versuchen wurde den Tieren vergleichend ohne vorherigen Ätherrausch sofort 12 %iger Alkohol zugeführt. Die damit verbundene Reizung der Tiere durch die Magensondierung führte zu einer stundenlangen Anti-Diurese. Auch der Versuch einer Betäubung mit Avertin (1,2 cmm der 3 %igen Avertinlösung pro 100 g Rattengewicht) bewirkte bei vielen Tieren eine Diuresehemmung störenden Ausmasses. Äther reizte andererseits die

Schleimhäute ziemlich stark und führte zu einer unerwünschten Bronchialsekretion, die wiederum nachteilige Folgen auf die Atmung zeigte. Auch ist nach tiefer Äthernarkose regelmässig eine Antidiurese zu verzeichnen. DICKER zeigte, dass nur der Äthylalkohol imstande ist, die ADH-Eigenproduktion der Ratte zu hemmen und dass der Adiuretinspiegel während einer Alkohol-Diurese weniger als 3, 5 Mikroeinheiten/ml Plasma bei der Ratte beträgt. Um also durch das zu testende, zugeführte ADH eine Antidiurese zu erzeugen, eine Diurese-Beeinflussung durch eine Ausschüttung von endogenem ADH aber zu vermeiden, wurde auf Avertin und ähnliche Narkosemittel verzichtet und lediglich der kurze Ätherrausch in Kauf genommen.

Beim BURN-Test sowie bei vielen der angegebenen Methoden (GILLMANN und GOODMAN, ROBINSON und FARR, HAM und LANDIS, BIRNIE, JENKINS und EVERSOLE und GAUNT; RALLI, ROBSON, CLARKE und HOAGLAND; STEIN, JINKS und MIRSKY) werden die nicht anästhesierten Ratten benützt. Die damit verbundene emotionelle und mechanische Reizbarkeit der Tiere und die durch die Applikationsweise des Testmaterials hervorgerufenen Schmerzreize mussten also auch ohne Anwesenheit von ADH im Testmaterial zu einer Diuresehemmung führen und so eine antidiuretische Aktivität vortäuschen (PICKFORD, VAN DYKE u. M., MIRSKY u. M.).

JEFFERS, LIVEZEY und AUSTIN, später dann auch BOURA und DICKER anästhesierten die Versuchstiere mit 12 %igem Äthylalkohol in einer Menge von 5 % des Körpergewichtes. 30 Minuten nach der Alkoholgabe wird dann Wasser in einer Menge von 3 % des Körpergewichtes gegeben. CRAWFORD und PINKHAM verzichteten auf eine Narkose der Versuchstiere. Durch wiederholtes Einführen einer dünnen Magensonde aus Gummi und durch wiederholte intraperitoneale Injektionen einer isotonischen Lösung versuchen sie einige Tage vor den Versuchen, die Tiere an diese Manipulationen und schmerzhaften Stimuli zu gewöhnen. HOLECEK, POLAK u. M. führten mittels einer Magensonde 12 %igen Alkohol und zwar 3 % des Körpergewichtes zu. Nach 20 Minuten wiederholten sie diese Alkoholgabe. Bei Nachlassen der Anästhesie während eines Versuches korrigierten sie diese durch zusätzliche Gaben von 1 - 2 ml 12 %igem Alkohol. Diese zusätzlichen Alkoholzufuhren führten niemals zu einer Veränderung weder der antidiuretischen Reaktion noch der Grösse der Veränderungen. PAULISCH verwandte zur Narkose 5 ccm 12 %igen Alkohols pro 100 g Körpergewicht. Bei allen ebenso durchgeführten eigenen Versuchen zeigte sich aber, dass die Tiere zwar nachhaltig narkotisiert waren, dass aber die Diurese der gut hydrierten Tiere jedesmal beeinträchtigt war und nach 1 - 2 Stunden vollkommen aufhörte und sich bei maximal gefülltem Darm terminal ein Lungenödem einstellte. Es wurden deshalb nur initial wenige ccm 12 %igen Alkohols gegeben und mit 3 %igem bzw. 1 %igem Alkohol die dauerhafte Sedierung zu erreichen versucht. Ausscheidungsverzögerungen nach Perioden von starker Diurese,

wie sie PAULISCH nach Gaben von 2 %igem Alkohol gesehen hat, konnten von uns nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Diurese um so rascher und intensiver erfolgte, je oberflächlicher die Narkose der Tiere während der Versuche gehalten wurde.

4. Bestimmung des Nullpunktes

Die Empfindlichkeit der Tiere gegen ADH nimmt mit dem Grad der Hydratisierung zu. Daher wird das Ergebnis der Tests umso genauer, je grösser die Diuresegeschwindigkeit ist. Da aber nach der Injektion von Testmaterial oder ADH die Diuresehemmung oft langsam, bei manchen Versuchen fast unmerklich einsetzt, ja sich sogar die normale Diurese nach der Injektion für einige Augenblicke noch steigern kann, ehe ADH zur Wirkung gekommen ist, wird die zur Berechnung notwendige Festlegung des Nullpunktes gelegentlich schwierig, weil hohe Diuresegeschwindigkeit und Diuresehemmung nicht immer durch eine eindeutige Zäsur abgesetzt sind. Nach DICKER muss dann der Nullpunkt 2 Minuten nach der Injektion markiert werden. Um unter diesen Bedingungen also eine zusätzliche Fehlerquelle zu vermeiden, ist eine besonders sorgfältige Zeitmarkierung auf dem Registriergerät, eventuell durch eine Hilfsperson im Augenblick der Injektion des wirksamen Materials erforderlich.

5. Praktische Durchführung des ADH-Testes

Nachdem die Tiere vor Versuchsbeginn ausreichend hydriert wurden, erfolgt eine dauerhafte, nicht zu tiefe Narkose mit 12 %igem Äthylalkohol. In die Blase wird ein PVC-Katheter eingelegt, in eine der 4 Schwanzvenen eine Kanüle eingebunden. Auf einem Holzbrettchen wird das Versuchstier in den Versuchskasten geschoben. Die Magensonde wird mit dem Magnetventil, der Blasenkathe-ter mit den Elektroden verbunden. Ist eine gleichmässige Ausscheidung von nicht weniger als 0,1 ml/min. für 20 Minuten erreicht, dann werden zur Aufstellung der Eichkurve zwei Verdünnungen von ADH, z.B. 25 und 50 ME injiziert. Nach weiteren 15 Minuten normaler Diurese kann jeweils 1 ccm des auf ADH zu testenden Plasmas injiziert werden, und zwar zwei Verdünnungen, 1 : 1 und 1 : 2. Der Vergleich zwischen Diuresehemmungen der ADH-Standardlösungen und des Testmaterials ergibt den ADH-Wert des Plasmas, der sich auf der Abszisse ablesen lässt. (Siehe Abb. 11).

Zur Verdünnung des Plasmas wird zweckmässigerweise physiologische Kochsalzlösung verwandt. Wird unverdünntes Plasma injiziert, so sollten wegen der Vermehrung des Blutvolumens nicht mehr als 2 Injektionen durchgeführt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode zur biologischen Bestimmung von Adiuretin aus menschlichem Plasma an der Ratte beschrieben, die auf den Arbeiten von JEFFERS u. M. und DICKER basiert. Als Ausgangspunkt diente die Versuchsanordnung von PAULISCH. Sie wurde in den angegebenen Punkten verbessert. Die dabei aufgetretenen methodischen Probleme während der Testdurchführung wurden diskutiert.

Die Versuche wurden an insgesamt ca. 500 Tieren ausgeführt. Davon schieden ca. 30 %, also etwa 150 Tiere noch vor der ersten Injektion der Tonephin-Standardlösung zur Gewinnung der Eichkurven wegen gestörter Atmung oder ungenügender bzw. unregelmässiger Diurese aus. Auch von den übrigen 350 Tieren erreichten nur 70 Tiere eine optimale Diurese, sodass während des Versuchablaufes alle 4 Tonephin-Dosen injiziert werden konnten. Bei 280 Tieren konnte der Versuch nicht vollständig zu Ende geführt werden, da früher oder später infolge einer schlechten Atmung bzw. eines Lungenödems plötzliche Diuresehemmungen oder Perioden unregelmässiger und zu geringer Diurese bis zu Anurie eintraten.

Die Vorzüge dieser Modifikation der biologischen ADH-Bestimmung an der Ratte werden also durch verhältnismässig geringe Störungsmöglichkeiten und Zufälligkeiten des Tiermaterials weitgehend aufgehoben.

So ergaben sich schliesslich aus den 350 Einzeltieren nur 12 Kurven, deren Werte die "Mittelwertskurve" mit einem Regressionskoeffizienten von 1,068 und einer Signifikanz von $P = < 0,0001$ ergaben. Diese Signifikanz zeigt also eine hohe Genauigkeit der Methode, das Verhältnis zwischen den bei einem Versuchsgang brauchbaren und unbrauchbaren Tieren von 1 : 4 demonstriert jedoch ihre trotzdem unbefriedigende Eignung für klinische Fragestellungen bzw. Routineuntersuchungen.

VI. ANHANG

1. Literatur

1. VELDEN, R.v.d.: Berl. klin. Wschr. 1913:2083.
2. FARINI, A.: Gazz. Osp. 34:1135 (1913)
3. FRANK, E.: Berl. klin. Wschr. 1910:1257
4. MAGNUS und SCHÄFER, E.A.:
J. Physiol. 27, IX P (1901)
5. STARLING, E.H. und E.B. VERNEY:
Proc. Roy. Soc. 97:103-321 (1925)
6. HANN, F.v.: Frankf. Z. Path. 21:337 (1918)
7. CAMUS, J. und ROUSSY, G.:
Endocrinology 4:507 (1920)
8. BALLEY, P. und BREMER F.:
Endocrinology 5:761 (1921)
9. FISCHER, C., W.R. INGRAM und S.W. RANSON:
Diabetes insipidus and the neurohormonal control
of water balance, Ann Arbor 1938
10. SCHARRER, E.: Z. vergl. Physiol. 7:1 (1928)
11. HILD, W.: Arch. path. Anat. 319:526 (1951)
12. BARGMANN, W.: Z. Zellforschg. 34 + 610 (1949)
13. GILLMAN, A. und GOODMAN, L.:
J. Physiol. 90:113 (1937)
14. VERNEY, E.B.: Lancet 1946:739 und 781
15. DYKE, H.B.v., K. ADAMSON jr. und S.L. ENGEL:
Rec. Progr. Hormone Res. 11:1 (1955)
16. BURN, J.H.: Quart. J. Pharm. & Pharmacol. 4:517 (1931)
17. GINSBURG, M. und H. HELLER:
J. Endocrin. 9:274 und 283 (1953)
18. CROXATTO, H.L., BARNAFI, R. LOPEZ and F. ANDRADE:
Metabolism 3, 32 (1954)

19. NOBLE, R.L. und N.B. TAYLOR:
J. Physiol. 122:220 (1953)
20. NOBLE, R.L., E.R. PLUNKETT und N.B. TAYLOR:
Rec. Progr. Hormone Res. 5:263 (1950)
21. ANSELMINO, K.J. und HOFFMANN:
Klin. Wschr. 1931:1438
22. ROBINSON, F.H. jr. und L.E. FARR:
Ann. Int. Med. 14:42 (1940)
23. HAM, G.G. und E.M. LANDIS:
J. clin. Invest. 21:455 (1942)
24. JEFFERS, W.A., M.M. LIVEZEY und J.H. AUSTIN:
Proc. Soc. Exper. Biol. und Med. 50:184 (1942)
25. BIRNIE, J.H., W.J. EVERSOLE, W.R. BOSS, C.M. OSBORN und R. GAUNT:
Endocrinolog. 47:1 (1950)
26. RALLI, E.P., J.S. ROBSON, D. CLARK und C.L. HOAGLAND:
J. clin. Invest. 24:316 (1945)
27. BIRNIE, J.H., R. JENKINS, W.J. EVERSOLE und R. GAUNT:
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 70:83 (1949)
28. STEIN, M., R. JINKS und I.A. MIRSKY:
Endocrinol. 51:492 (1952)
29. BLISS, C.J.:
Science 100:577 (1944)
30. ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN, W.P. KENNEDEY:
Edinburgh M. J. 39:376 (1932)
31. BOURA, A. und S.E. DICKER:
J. Physiol. 122:144 (1953)
32. CRAWFORD und PINKHAM: Endocrinology 55:521 (1954)
33. HOLECEK, V., H. POLAK, J. BLAHA und M. JIRASEK:
Endokrinologie 32:38 (1954)
34. HELLER und BLACKMORE, J.:
Endocrinol. 8:224 (1951)
35. AMES, MORE und VAN DYKE:
Endocrinol. 46:215 (1950)

36. PAULISCH, G.: Plüg. ARCH. Physiol. 246:314 (1957)
37. BUCHBORN, E.: Z. exper. Med. 125, 614 (1955)
38. ERSPAMER, V. und G. SALA:
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 9:31 (54)
39. ERSPAMER, V. und A. OTTOLENGHI:
Arch. internat. Pharmacodyn 93:177 (1953)
40. FARRIS, F.: Amer. J. Physiol. 144:331 (1945)
41. Mc CANN, W.S., K. YEAKEL and B. MEDOFF:
Amer. J. Med. Sci. 215:713 (1948)
42. SELYE, H.: Stress, Montreal 1950
43. SCHREIBER, J.: Cast, Prac. Lek. 2:153 (1950)
44. DICKER, S.E.: J. Physiol. 122:149 (1953)
45. MIRSKY, J.A. and M. STEIN:
Science 118:602 (1953)
46. MIRSKY, J.A., M. STEIN and G. PAULISCH:
Endocrinology 54:491 (1954)
47. O'CONNOR, W.J. and E.B. VERNEY:
Quart. J. Exper. Physiol. 31:393 (1942)
48. KELSALL, A.R.: J. Physiol. 109:150 (1949)
49. LEWIS, A.A.G.: J. Clin. Endocrinol. Metabol 13:769 (1953)
50. AMES, R.G. und H.B. VAN DYKE:
Endocrinol. 50:350 (1952)
51. RALLI, E.P., L.G. RAISZ, S.H. LESLIE, M.E. DUMM and B. LAKEN:
Amer. J. physiol. 163:141 (1950)

2. Kurvenbeispiele

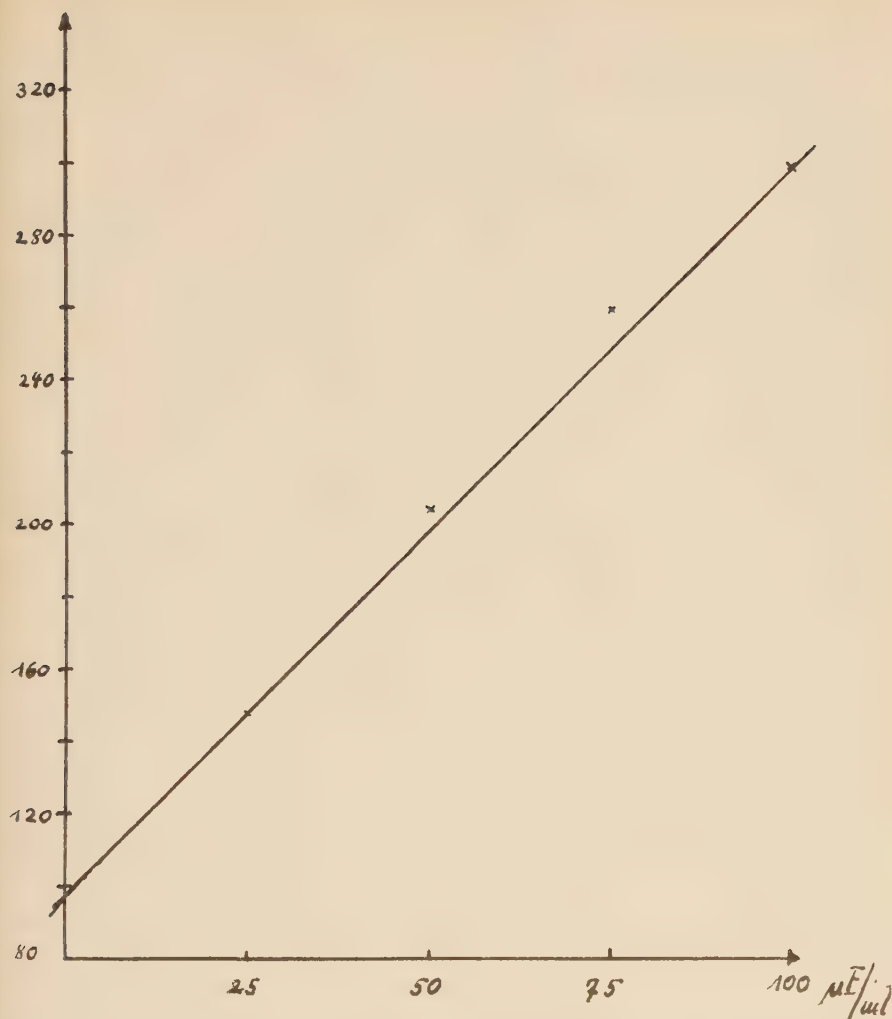


Abbildung 5: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tonephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindices sind:

25	:	147,71
50	:	205,17
75	:	259,82
100	:	300,00

(Kurve vom 1.11.58, - Kurve II)

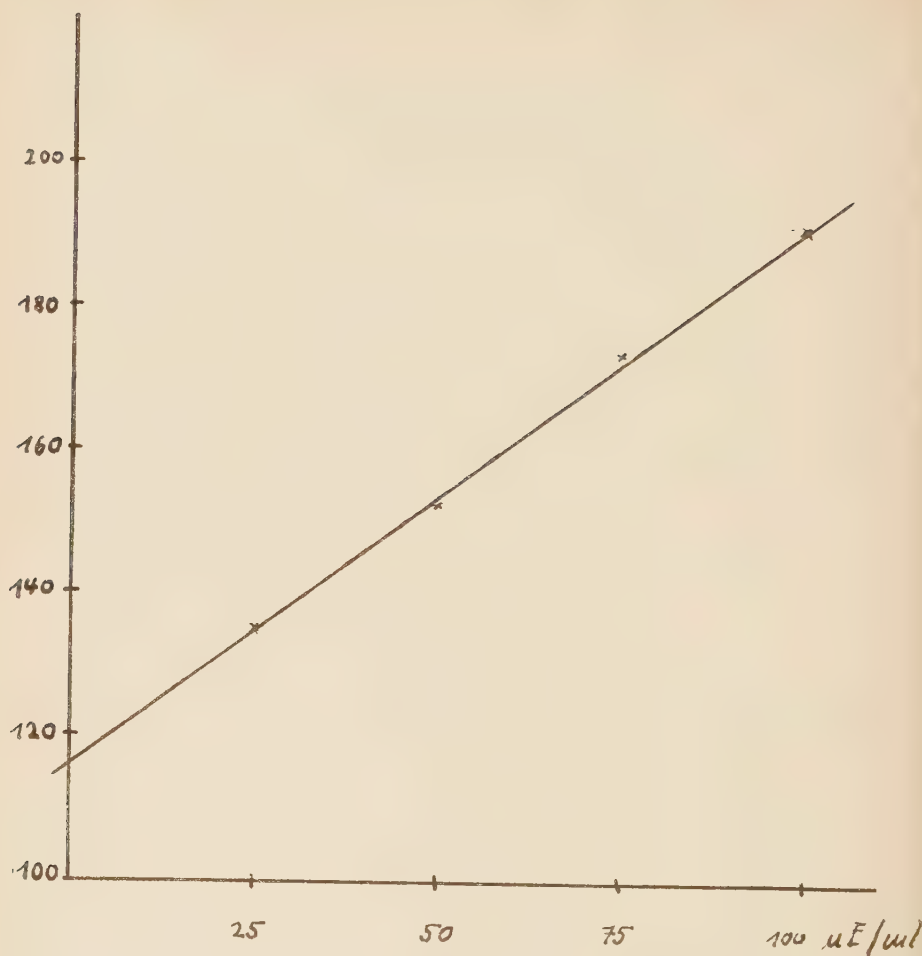


Abbildung 6: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tonephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindices sind:

25 : 135,10

50 : 151,50

75 : 173,40

100 : 190,30

(Kurve vom 24.2.59, - Kurve III)

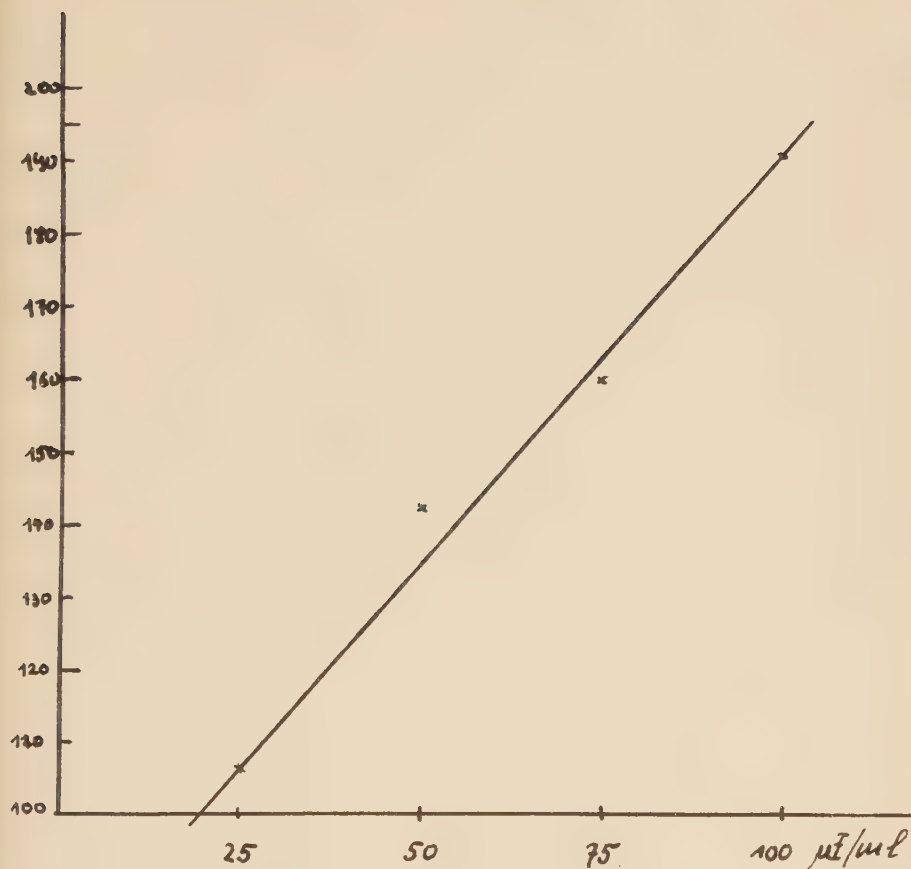


Abbildung 7: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tonephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindices sind:

25 : 113,00

50 : 144,44

75 : 160,00

100 : 192,97

(Kurve vom 19.1.59, - Kurve I)

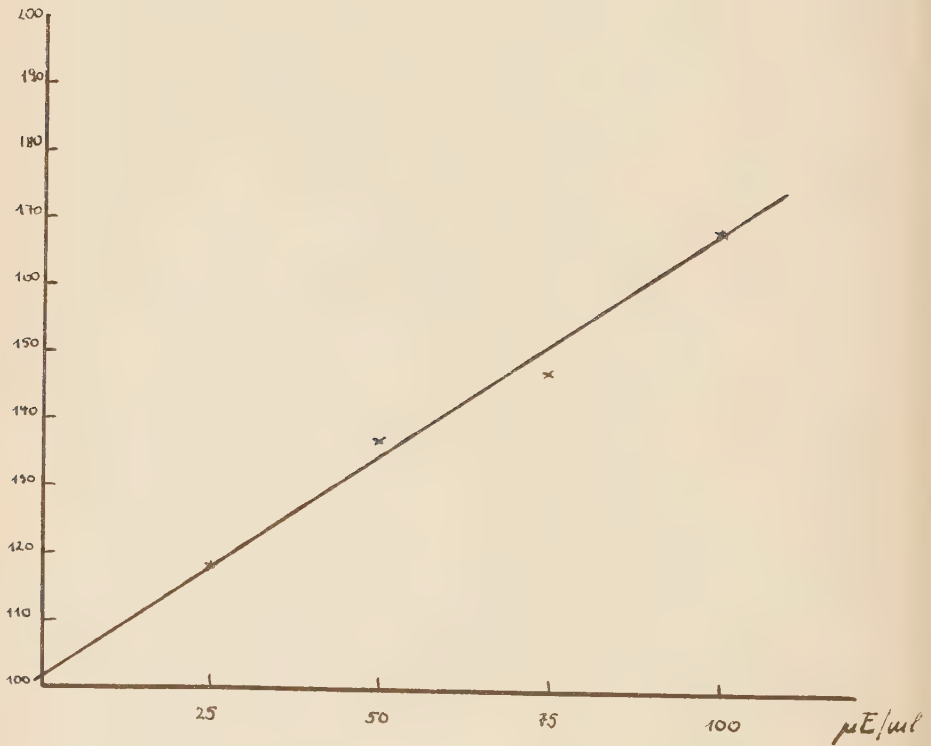


Abbildung 8: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tenephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindices sind:

25 : 118,48

50 : 136,69

75 : 146,58

100 : 167,74

(Kurve vom 15.11.58)

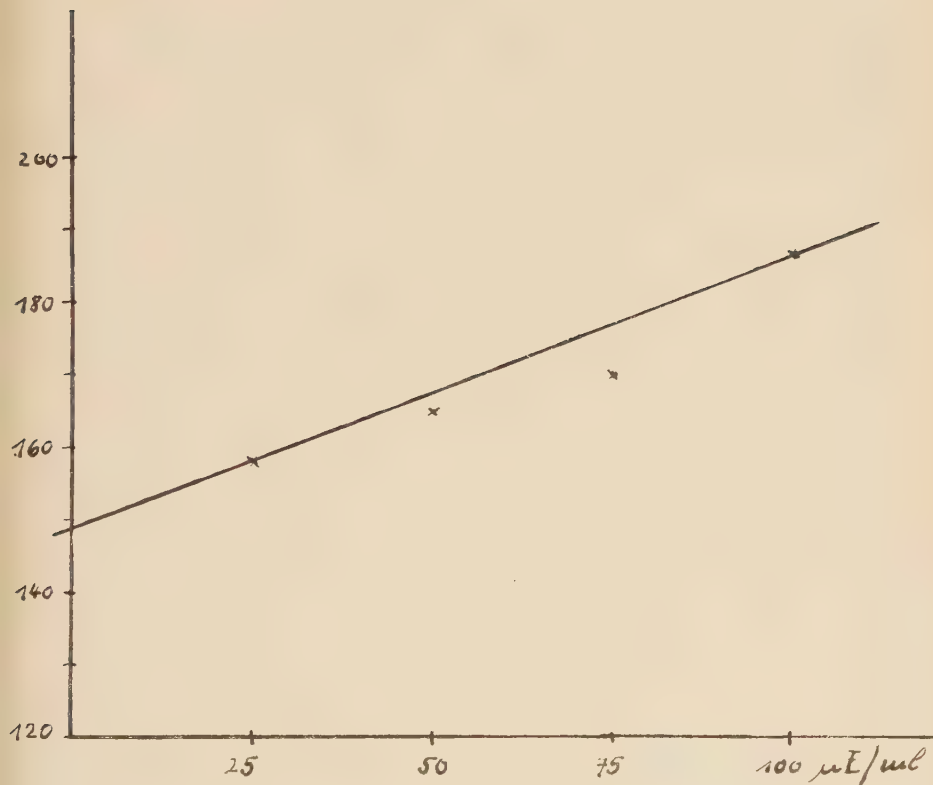


Abbildung 9: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tenephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindices sind:

25 : 158,12
 50 : 165,04
 75 : 170,15
 100 : 186,92

(Kurve vom 24.12.58, - Kurve II)

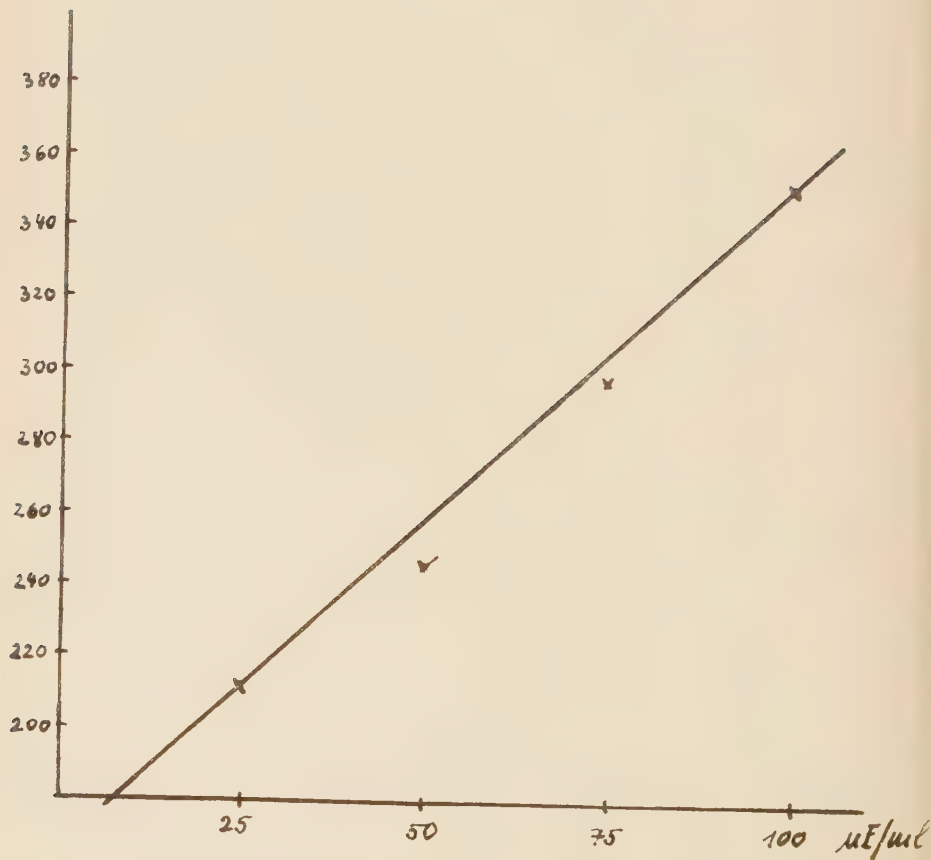


Abbildung 10: Normale Eichkurve mit vier Injektionen einer Tonephin-Standardlösung. Die genauen Werte der vier Wirkungsindizes sind:

25 : 211,70

50 : 246,16

75 : 297,85

100 : 349,54

(Kurve vom 13.10.58)

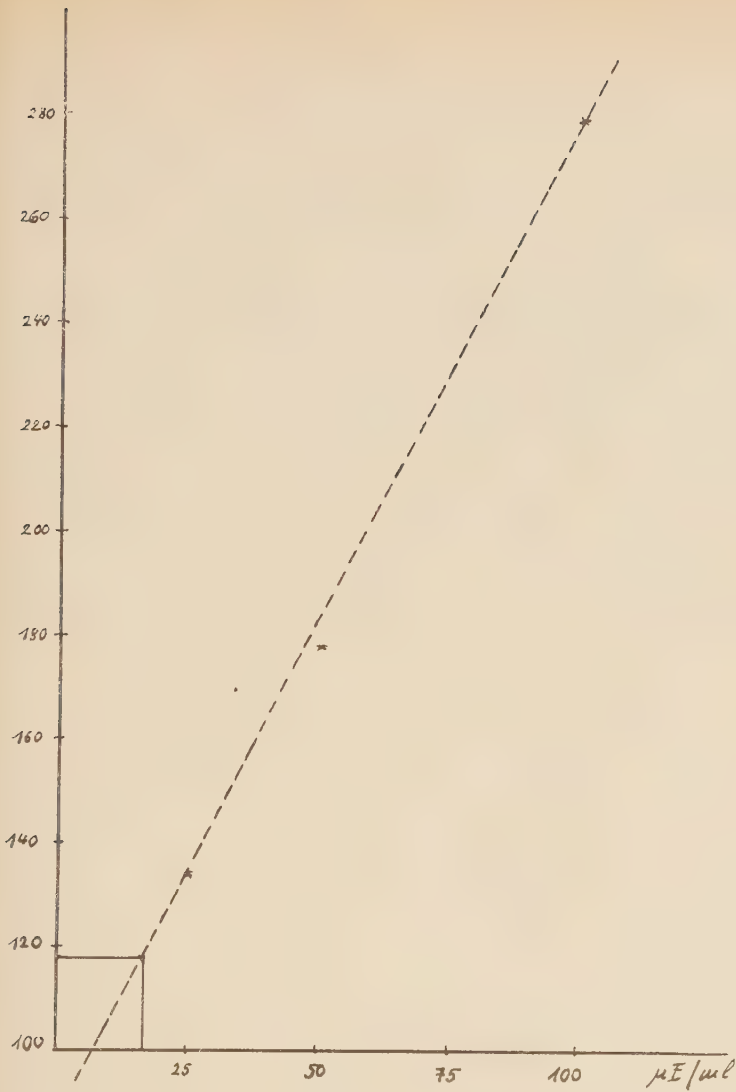


Abbildung 11: Kurvenbeispiel: Praktische Durchführung des ADH-Testes am Plasma des Patienten Langwieser (22. 2. 59).

Wirkungsindices der Eichkurve 25 : 134,31

50 : 178,26

100 : 280,00

Wirkungsindex nach der Plasmajektion; 118,43

ADH-Gehalt 17 mE/ml

Für die Überlassung des Themas sowie für die grosszügige Unterstützung der Arbeit in apparativer und finanzieller Hinsicht gebührt mein Dank Herrn Professor Dr. SCHWIEGK und Herrn Privatdozent Dr. E. BUCHBORN, sowie Herrn Dr. NIKLAS.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 12. November 1935 als Sohn des damaligen Regierungsforstrates Josef Schmid und seiner Ehefrau Berta, geb. Binder, in Zwiesler-Waldhaus, Gemeinde Lindberg, Kreis Regen geboren. Mit der dienstlichen Berufung meines Vaters als Forstmeister und Amtsvorstand kam ich 1938 nach Geisenfeld/Ilm, Kreis Pfaffenhofen, wo ich bei meinen Eltern die weitere Kindheit verbrachte. Von 1941 bis 1945 besuchte ich die dortige Volksschule. Im Herbst 1946 kam ich in das humanistische Gymnasium des Klosters Scheyern in Scheyern, Kreis Pfaffenhofen. Mit der Versetzung meines Vaters an das Forstamt Cham/Opf. trat ich 1948 in das dortige hum. Gymnasium über. Im Sommer 1954 legte ich in Cham die Reifeprüfung ab. Seit dem WS 1954/55 bin ich als Studierender der med. Fakultät an der Universität München eingeschrieben. Nach dem WS 1956/57 bestand ich an der Universität München das Physikum. Die klinischen Semester habe ich ebenfalls in München gehört. Das medizinische Staatsexamen habe ich in der Zeit von März bis Juni 1960 an der Universität in München abgelegt.



